

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

| | | | |
|---|--|---|---|
| (51) Internationale Patentklassifikation 6 : C12N 15/82, 15/55, A01H 5/00 | | A3 | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 95/06740 |
| | | | (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 9. März 1995 (09.03.95) |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP94/02935 | | (81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). | |
| (22) Internationales Anmeldedatum: 2. September 1994 (02.09.94) | | Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i> | |
| (30) Prioritätsdaten: P 43 29 828.1 3. September 1993 (03.09.93) DE | | (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 22. Juni 1995 (22.06.95) | |
| (71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Bunsenstrasse 10, D-37073 Göttingen (DE). | | | |
| (72) Erfinder; und | | | |
| (75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): TÖPFER, Reinhard [DE/DE]; Commerstrasse 16, D-50126 Bergheim (DE). MARTINI, Norbert [DE/DE]; Kolibriweg 8, D-50829 Köln (DE). SCHELL, Jozef [BE/DE]; Carl-von-Linné-Weg 12, D-50829 Köln (DE). | | | |
| (74) Anwalt: DRAUDT, Axel, H., Ch.; Maiwald & Partner, Balanstrasse 57, D-81541 München (DE). | | | |
| (54) Title: MEDIUM CHAIN-SPECIFIC THIOESTERASES | | | |
| (54) Bezeichnung: MITTELKETTENSPEZIFISCHE THIOESTERASEN | | | |
| (57) Abstract | | | |
| DNA sequences are disclosed that code for a middle chain-specific acyl-[ACP]-thioesterase, as well as alleles and derivatives of said DNA sequence. This DNA may be used to transform plants capable of forming middle chain-specific acyl-[ACP]-thioesterases. | | | |
| (57) Zusammenfassung | | | |
| Die Erfindung betrifft DNA-Sequenzen, die für eine mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase kodieren, und die Allele sowie Derivate dieser DNA-Sequenz. Mit dieser DNA können Pflanzen transformiert werden, die in der Lage sind, mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterasen zu bilden. | | | |

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | |
|----|--------------------------------|----|-----------------------------------|----|--------------------------------|
| AT | Oesterreich | GA | Gabon | MR | Mauretanien |
| AU | Australien | GB | Vereinigtes Königreich | MW | Malawi |
| BB | Barbados | GE | Georgien | NE | Niger |
| BE | Belgien | GN | Guinea | NL | Niederlande |
| BF | Burkina Faso | GR | Griechenland | NO | Norwegen |
| BG | Bulgarien | HU | Ungarn | NZ | Neuseeland |
| BJ | Benin | IE | Irland | PL | Polen |
| BR | Brasilien | IT | Italien | PT | Portugal |
| BY | Belarus | JP | Japan | RO | Rumänien |
| CA | Kanada | KE | Kenya | RU | Russische Föderation |
| CF | Zentrale Afrikanische Republik | KG | Kirgisistan | SD | Sudan |
| CG | Kongo | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | SE | Schweden |
| CH | Schweiz | KR | Republik Korea | SI | Slowenien |
| CI | Côte d'Ivoire | KZ | Kasachstan | SK | Slowakei |
| CM | Kamerun | LI | Liechtenstein | SN | Senegal |
| CN | China | LK | Sri Lanka | TD | Tschad |
| CS | Tschechoslowakei | LU | Luxemburg | TG | Togo |
| CZ | Tschechische Republik | LV | Lettland | TJ | Tadschikistan |
| DE | Deutschland | MC | Monaco | TT | Trinidad und Tobago |
| DK | Dänemark | MD | Republik Moldau | UA | Ukraine |
| ES | Spanien | MG | Madagascar | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| FI | Finnland | ML | Malai | UZ | Usbekistan |
| FR | Frankreich | MN | Mongolei | VN | Vietnam |

Mittelkettenspezifische Thioesterasen

Die Erfindung betrifft DNA-Sequenzen, die für eine mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase kodieren, und die Allele sowie Derivate dieser DNA-Sequenzen.

Die Thioesterasen sind wesentlich an der Produktion von Fettsäuren in pflanzlichen Organismen beteiligt. Die Fett-säure- und Triacylglyceridbiosynthese lassen sich aufgrund der Kompartimentierung als getrennte Biosynthesen, jedoch im Hinblick auf das Endprodukt, als ein Biosyntheseweg ansehen. Die de novo Biosynthese von Fettsäuren erfolgt in den Plastiden und wird von drei Enzymen bzw. Enzymsystemen katalysiert, d.h. der Acetyl-CoA Carboxylase (ACCase), der Fettsäuresynthase (FAS) und der Acyl-[ACP]-Thioesterase (TE).

Endprodukte dieser Reaktionsfolge sind in den meisten Organismen entweder Palmitin-(C_{16:0}), Stearin-(C_{18:0}) und, nach einer Desaturierung, Ölsäure (Δ9C_{18:1}). Der Acyl-[ACP]-Thioesterase (TE) kommt die Funktion der Kettenlängen-termination zu.

Im Cytoplasma dagegen erfolgt am Endoplasmatischen Reticulum die Triacylglyceridbiosynthese im sogenannten "Kennedy Pathway" aus Glycerin-3-Phosphat, das wahrscheinlich durch die Aktivität der Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenase (G3P-DH) bereitgestellt wird, und Fettsäuren, die als Acyl-CoA-Substrate vorliegen.

In tierischen Systemen (z.B. bei der Ratte) ist die Acyl-[ACP]-Thioesterase ein integraler Bestandteil der FASI und dort für die Termination der Fettsäurebiosynthese verantwortlich. Eine zweite Acyl-[ACP]-Thioesterase (TEII), die

gewebespezifisch exprimiert wird, sorgt jedoch in milchproduzierenden Brustdrüsen der Ratte für eine frühzeitige Termination der Kettenverlängerung bei der Fettsäurebiosynthese und für eine Freisetzung von C_{10:0} und C_{12:0} Fettsäuren. Eine Expression dieser TEII in Mausfibroblasten führte in diesen Zellen zu einer Bildung der genannten mittelkettigen Fettsäuren und belegt somit, daß dieses Enzym entscheidend an der Termination der Kettenlänge beteiligt ist. (S.A. Bayley et al., Bio/Technology 6, Seiten 1219-1221 (1988)).

Auch in Pflanzen wurden Acyl-[ACP]-Thioesterasen gereinigt und auf ihre Aktivität untersucht. Acyl-[ACP]-Thioesterasen mit Präferenz für die Hydrolyse langkettiger Acyl-[ACP]-Verbindungen wurden aus Carthamus tinctorius (T.A. McKeon et al., J.Biol.Chem. 257, Seiten 12141-12147 (1982)), Cucurbita moschata (H. Imai et al., Plant.Mol.Biol. 20, Seiten 199-206 (1992)) und Brassica napus (A. Hellyer et al., Plant.Mol.Biol. 20, Seiten 763-780 (1992)) gereinigt. Entsprechende cDNAs wurden bereits von Carthamus tinctorius (D.S. Knutzon et al., Plant Physiol. 100, Seiten 1751-1758 (1992)) und Brassica napus (E.S. Loader et al., Plant.Mol.Biol., Vol. 23, Seiten 769 bis 778 (1993)) isoliert. Eine weitere TE mit Spezifität für die Hydrolyse von C_{12:0}-[ACP] wurde aus Umbellularia californica (Kalifornischer Lorbeer) isoliert und von der Aktivität einer C_{18:0}-[ACP] spezifischen TE getrennt (M.R. Pollard et al., Art.Biochem.Biophys. 284, Seiten 306-312 (1991)). In Cuphea lanceolata wurde ebenfalls die Aktivität einer mittel- und einer langkettenspezifischen TE nachgewiesen (P. Dörmann et al., Planta 189, Seiten 425-432 (1993)).

Ein nur teilweise gereinigtes Enzympräparat einer C_{10:0}-spezifischen Acyl-[ACP]-Thioesterase aus Cuphea hookeriana ist in der WO 91/16421 beschrieben. Wie Messungen von Hydrolyseaktivitäten des Enzyms gegenüber verschiedenen Substraten zeigen, liegen erhebliche Anteile an Aktivitäten vor, die nicht C_{10:0}-spezifisch sind.

Für die TE aus *Umbellularia californica* wurde eine cDNA, die für eine mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase codiert, isoliert. Sie führte in transgenen *Arabidopsis thaliana*- und *B. napus*-Pflanzen zur Bildung mittelkettiger Fettsäuren im Samen, insbesondere von Laurinsäure ($C_{12:0}$) und in geringen Mengen Myristinsäure ($C_{14:0}$); (T.A. Voelker *et al.*, *Science* **257**, Seiten 72-74 (1992) und H.M. Davies und T.A. Voelker in Murata, N. and C. Somerville (Herausgeber): *Current Topics in Plant Physiology: Biochemistry and Molecular Biology of Membrane and Storage Lipids of Plants*, Vol. 9, Seiten 133-137; American Society of Plant Physiologists, Rockville (1993)).

Es besteht eindeutig ein erhöhter Bedarf an Bereitstellung mittelkettiger Fettsäuren, wie beispielsweise Caprinsäure ($C_{10:0}$), die als Grundstoffe für Weichmacher, Schmierstoffe, Pestizide, Tenside, Kosmetika usw. industriell einsetzbar sind. Eine Möglichkeit zur Bereitstellung dieser Fettsäuren besteht in der Isolation (Extraktion) der Fettsäuren aus Pflanzen, die besonders hohe Gehalte dieser Fettsäuren aufweisen. Die Erhöhung von Gehalten an mittelkettigen Fettsäuren auf klassischem Wege, also durch Züchtung von Pflanzen, die in erhöhtem Maße diese Fettsäuren produzieren, konnte bisher nur bedingt erreicht werden.

Es ist daher Aufgabe der Erfindung, Gene bzw. DNA-Sequenzen zur Verfügung zu stellen, die zur Verbesserung des Ölertrags und zur Produktion von mittelkettigen Fettsäuren in Pflanzen, die selbst nicht zur Herstellung solcher Fettsäuren in der Lage sind oder nur in geringem Maß diese Fettsäuren produzieren, eingesetzt werden können.

Diese Aufgabe wird mit den DNA-Sequenzen gemäß Patentanspruch 1 bzw. den Genen aus den genomischen Klonen gemäß Patentanspruch 6 gelöst.

Die Erfindung betrifft DNA-Sequenzen, die für eine mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase kodieren, und die Allele sowie Derivate dieser DNA-Sequenzen.

Die Erfindung betrifft weiterhin genomische Klone, die DNA-Sequenzen, die für eine mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase kodieren und Promotoren sowie Regulatorsequenzen enthalten, und die Allele sowie Derivate dieser DNA-Sequenzen.

Die Erfindung betrifft außerdem ein Verfahren zur Herstellung von Pflanzen, Pflanzenteilen und Pflanzenprodukten, bei dem auf gentechnologischem Weg eine DNA-Sequenz, die für eine mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase kodiert, übertragen wird.

Die Erfindung betrifft schließlich auch die Verwendung dieser DNA-Sequenz zur Übertragung von Genen für mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterasen in Pflanzen.

Die Erfindung betrifft zudem noch Pflanzen, Pflanzenteile und Pflanzenprodukte, die nach dem oben genannten Verfahren hergestellt werden.

Die Figuren dienen zur Erläuterung der vorliegenden Erfindung.
Es zeigen:

Figur 1 die Darstellung der DNA- bzw. Aminosäuresequenz der degenerierten Oligonukleotide 3532 und 2740;

Figur 2 die Restriktionskarten der genomischen Klone für die Acyl-[ACP]-Thioesterase ClTEg1, ClTEg16, ClTEg4 und ClTEg7 aus *Cuphea lanceolata*;

Figur 3 einen Vergleich der Aminosäuresequenzen von Thioesterasen aus verschiedenen Pflanzen;

- Figur 4** funktionelle Teile aus binären Vektoren zur Expression der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen bzw. Gene aus den genomischen Klonen in transgenen Pflanzen;
- Figur 5** das Gaschromatogramm von in unreifem Rapssamen enthaltenen Fettsäuren (pNBM99-2TE);
- Figur 6** das Gaschromatogramm von in unreifem Tabaksamen enthaltenen Fettsäuren (pNBM99-2TE);
- Figur 7** das Gaschromatogramm von in reifem Rapssamen enthaltenen Fettsäuren (pNBM99-TEg1); und
- Figur 8** das Gaschromatogramm von in reifem Rapssamen enthaltenen Fettsäuren (pNBM99-TEg16).

Es ist selbstverständlich, daß im Rahmen der Erfindung auch allelische Varianten und Derivate der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen erfaßt sind, unter der Voraussetzung, daß diese modifizierten DNA-Sequenzen und Gene für mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterasen kodieren. Zu den allelischen Varianten und Derivaten zählen beispielsweise Deletionen, Substitutionen, Insertionen, Inversionen oder Additionen der erfindungsgemäßen DNA-Sequenz.

Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen sowie die Gene aus den genomischen Klonen kodieren für mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterasen, die die Bildung von C_{8:0} bis C_{14:0}-Fettsäuren katalysieren. Die Erfindung bezieht sich insbesondere auf C_{10:0}-spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterasen oder im wesentlichen C_{10:0}-spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterasen und C_{14:0}-spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterasen oder im wesentlichen C_{14:0}-spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterasen, die bei der Fettsäuresynthese verantwortlich für die Bildung von Caprinsäure bzw. Myristinsäure sind.

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung von Genen, die für mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterasen kodieren, ist jedes Pflanzenmaterial geeignet, das diese Thioesterasen in ausreichender Menge produziert. Als besonders geeignetes Ausgangsmaterial hat sich in der vorliegenden Erfindung die in Mittelamerika beheimatete Pflanze Cuphea lanceolata erwiesen. Die Samen dieser Pflanze enthalten 83% Caprinsäure.

Zur Isolierung der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen wurde eine cDNA-Bank aus Cuphea lanceolata (Wildtyp) mittels einer durch PCR (Polymerase Chain Reaction) hergestellten Hybridisierungssonde, PCR42, nach Genen für mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterasen durchsucht. Auf diese Weise wurden die cDNA-Klone ClTE13, ClTE5 und ClTE12 isoliert.

Die erhaltenen cDNAs wurden in üblicher Weise vollständig doppelsträngig sequenziert. Die ClTE13-cDNA umfaßt als ApaI-Eco RI-Fragment 1494 bp und enthält das vollständige Strukturgebnis für eine mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase. Die ClTE13-cDNA kodiert für ein Protein mit 414 Aminosäuren einschließlich eines abgeleiteten Transitpeptids mit 111 Aminosäuren. Als SEQ ID NO:1 im Sequenzprotokoll ist die vollständige DNA-Sequenz des 1494 bp cDNA-Fragments mit der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz wiedergegeben. Der kodierende Bereich erstreckt sich von Position 83 bis Position 1324 der DNA-Sequenz. Das offene Leseraster beginnt an Position 83 mit dem Startkodon "ATG", welches für die Aminosäure Methionin kodiert und endet an Position 1324 mit dem Stopkodon "TAG". Das abgeleitete Molekulargewicht des reifen Proteins beträgt 34 kDa.

Die DNA-Sequenzanalyse der beiden weiteren cDNAs ClTE5 und ClTE12 hat ergeben, daß diese nicht das vollständige Strukturgebnis einer mittelkettenspezifischen Acyl-[ACP]-Thioesterase enthalten. Die DNA-Sequenzen der genannten cDNAs mit den daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO:2 und SEQ ID NO:3 aufgeführt. Die

ClTE5-cDNA als Eco RI-XbaI-Fragment hat eine Länge von 1404 bp und kodiert gemäß dem offenen Leseraster für ein Protein mit 375 Aminosäuren, wobei 34 Aminosäuren des Transitpeptids fehlen im Vergleich zur abgeleiteten Aminosäuresequenz zur ClTE13. Die ClTE12-cDNA hat als Eco RI-XbaI-Fragment, randständige XbaI-Schnittstelle, eine Länge von 1066 bp und kodiert gemäß dem offenen Leseraster für ein Protein mit 287 Aminosäuren, wobei 20 Aminosäuren des reifen Proteins und das Transitpeptid fehlen.

In der nachfolgend angegebenen Tabelle I wird der Homologiegrad bzw. Identitätsgrad der Acyl-[ACP]-Thioesterase-Aminosäuresequenzen der reifen Proteine der ClTE5- und ClTE13-cDNAs (abgeleitet aus der DNA-Sequenz) aus Cuphea lanceolata, CtTE2-1 und CtTE5-2 aus Carthamus tinctorius und UcTE aus Umbellularia californica verglichen.

Tabelle I

| | CITE5 | CITE13 | CtTE2-1 | CtTE5-2 | UcTE | |
|-------------------|-------|--------|---------|---------|-------|-------------------|
| CITE5 | | 91,3% | 44,8% | 48,2% | 57,0% | Prozent Identität |
| CITE13 | 96,0% | | 44,2% | 45,7% | 57,9% | |
| CtTE2-1 | 67,1% | 67,6% | | 82,5% | 39,7% | |
| CtTE5-2 | 71,1% | 69,5% | 91,1% | | 41,6% | |
| UcTE | 75,1% | 76,3% | 63,8% | 62,7% | | |
| Prozent Homologie | | | | | | |

Der Vergleich der TE-Aminosäuresequenz von ClTE13 mit der Thioesterase aus *U. californica* (UcTE) zeigt mit 57,9% identischen Aminosäuren eine recht hohe Übereinstimmung, die größer ist als diejenige zu den langkettenspezifischen Thioesterasen aus *C. tinctorius* (CtTE2-1 und CtTE5-2). So zeigt ebenfalls die Thioesterase der ClTE5 mit einer Identität von 57,0% zu UcTE einen recht hohen Identitätsgrad.

Figur 3 zeigt einen Aminosäuresequenzvergleich von Thioesterasen aus Pflanzen. Die Sequenzen der reifen Proteine (Ausnahme: ClTE12, -20 Aminosäuren) sind von den entsprechenden Thioesterase (TE) cDNAs aus *Carthamus tinctorius* = Ct, *Cuphea lanceolata* = Cl, *Brassica napus* = Bn und *Umbellularia californica* = Uc abgeleitet. PCR42 ist das PCR-Produkt, das zum Screenen der cDNA-Bank verwendet wurde. Die Lücke zwischen den Positionen 374 und 393 (ca. 20 Aminosäuren) tritt nur bei den mittelkettenspezifischen Thioesterasen auf und liegt nahe vor dem einzigen über alle Sequenzen konservierten Cystein (Position 359), dem mutmaßlichen aktiven Cystein-Rest. Durch Veränderung der Sequenzabschnitte zwischen den genannten Positionen und andere, siehe unten, kann durch Genengineering Einfluß auf die Kettenlängenspezifität der Thioesterasen genommen werden.

Des weiteren wurden genomische Klone aus *Cuphea lanceolata* isoliert und charakterisiert, die das vollständige Strukturen einer mittelkettenspezifischen Acyl-[ACP]-Thioesterase sowie dazugehörige Regulatorsequenzen (wie Promotoren und Terminatoren) enthalten. Das bedeutet also, daß sie vollständige Transkriptionseinheiten bilden. Beim Screenen einer genomischen DNA-Bank von *Cuphea lanceolata* mit der ClTE5-cDNA als Sonde wurden 23 genomische Klone isoliert. Die genomischen Klone ClTEg1, ClTEg16, ClTEg4 und ClTEg7 sind in Figur 2 gezeigt und anhand einer Restriktionsanalyse mit verschiedenen Restriktionsenzymen charakterisiert. Es handelt sich dabei um DNA-Fragmente, die eine Größe von 12,7 kb für ClTEg1, 17,4 kb für ClTEg16, 13,5 kb für ClTEg4 und 14,7 kb für ClTEg7

aufweisen. Die Restriktionskartierung hat ergeben, daß die gezeigten genomischen Klone vier verschiedenen Klassen von Genen zuzuordnen sind. Es ist aufgrund von Sequenzdaten festgestellt worden, daß die cDNA ClTE5 dem Gen aus dem genomischen Klon ClTEg4, die ClTE12-cDNA dem Gen aus dem genomischen Klon ClTEg1, die ClTE13-cDNA dem Gen aus dem genomischen Klon ClTEg7 und das PCR-Produkt PCR42 dem Gen aus dem genomischen Klon ClTEg16 entsprechen.

Anhand der beschriebenen cDNA-Sequenzen wurden interne, am 5'-Ende liegende Sequenzprimer abgeleitet. Mit diesen wurden an den genomischen Klonen als Matrize Sequenzdaten gewonnen, die Aufschluß über den Beginn des kodierenden Bereichs und damit auch über die Begrenzung der Promotoren der Thioesterase-Gene gaben. Aufgrund dieser diagnostischen Sequenzabschnitte der genomischen Klone ClTEg1, ClTEg16, ClTEg4 und ClTEg7 im Bereich des jeweils kleinsten hybridisierenden Fragmentes (siehe schwarze Balken in Abbildung 2) konnte neben der Identität als Gene für mittelkettenspezifische Thioesterasen im Vergleich zur Aminosäuresequenz zur U. californica Thioesterase auch die Vollständigkeit der Thioesterase-Gene als Transkriptionseinheiten festgestellt werden.

Durch DNA-Sequenzanalyse von ausgewählten Sequenzabschnitten der genomischen Klone ClTEg1, ClTEg4, ClTEg7 und ClTEg16 wurden die Thioesterase-Gene identifiziert. Die sequenzierten Bereiche sind als weiße Balken unter den in Figur 2 gezeigten Klonen erkennbar. Alle Gene bestehen aus sieben Exons, wobei das erste Exon im nicht translatierten Bereich der mRNA liegt. Auf einem 4098 bp DNA-Fragment des Klons ClTEg1 befindet sich das Strukturgen einer mittelkettenspezifischen Acyl-[ACP]-Thioestrase, siehe SEQ ID NO:4 im Sequenzprotokoll. Der kodierende Bereich beginnt mit Exon II an Position 1787 und endet mit Exon VII an Position 3941. Das Strukturgen einer mittelkettenspezifischen Acyl-[ACP]-Thioesterase ist auf einem 4643 bp DNA-Fragment des Klons ClTEg7 enthalten. Wie aus SEQ ID NO:6 im Sequenzprotokoll zu entnehmen ist, beginnt der

kodierende Bereich an Position 773 mit Exon II und endet mit Exon VII an Position 3118. Der genomische Klon ClTEg16 enthält auf einem 5467 bp DNA-Fragment das Strukturgen einer mittelkettenspezifischen Acyl-[ACP]-Thioesterase, siehe SEQ ID NO:7 im Sequenzprotokoll. Der kodierende Bereich beginnt mit Exon II an Position 3284 und endet mit Exon VII an Position 5275. Der kodierende Bereich für das Strukturgen einer mittelkettenspezifischen Acyl-[ACP]-Thioesterase ist für den genomischen Klon ClTEg4 nur unvollständig vorhanden. SEQ ID NO:5 im Sequenzprotokoll zeigt auf einem 928 bp DNA-Fragment das Exon II an den Positionen 1 bis 502 sowie das unvollständige Intron II an den Positionen 503 bis 928.

Die Strukturgene für die in den genomischen Klonen ClTEg1, ClTEg7 und ClTEg16 nachgewiesenen mittelkettenspezifischen Acyl-[ACP]-Thioesterasen umfassen jeweils sieben Exons von fast gleicher Größe, wobei ebenfalls das Exon II der Thioesterase des Klons ClTEg4 in den Größenbereich der Exons II der übrigen Thioesterasen fällt. Dem Intron I aller Gene kommen möglicherweise bei der Genexpression genregulatorische Funktionen zu.

Der genomische Klon ClTEg4 wurde unter der Nummer DSM 8493 und der genomische Klon ClTEg7 unter der Nummer DSM 8494 am 27. August 1993 bei der DSM-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1B, D-38124 Braunschweig hinterlegt.

Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen, die für eine mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase kodieren können unter Anwendung gentechnologischer Verfahren (in Form von anti-sense oder Überexpression) in Pflanzen zur Produktion dieser Fettsäuren in diesen Pflanzen eingeführt bzw. übertragen werden. Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen werden, soweit sie nicht als vollständige Transkriptionseinheit vorliegen, vorzugsweise zusammen mit geeigneten Promotoren,

insbesondere in rekombinanten Vektoren, wie beispielsweise binäre Vektoren, in die Pflanzen eingeführt.

Die genomischen Klone ClTEg1, ClTEg16, ClTEg4 und ClTEg7 können als eigene vollständige Transkriptionseinheiten (enthaltend Promotor, Strukturen und Terminator) zur Transformation von Pflanzen, wobei mittelkettenspezifische Fettsäuren in den Speicherlipiden akkumuliert werden, verwendet werden. Die Ausbeute an mittelkettigen Fettsäuren kann durch Kreuzung und damit Kombination der Thioesterasegene optimiert werden. Eine Optimierung kann dahingehend stattfinden, daß der Gehalt an neu eingebrachten Fettsäuren erhöht wird oder verschiedene neue Fettsäuren gebildet werden.

Alle Arten von Pflanzen können für diesen Zweck transformiert werden. Es werden bevorzugt solche Pflanzen transformiert, die eine erhöhte Produktion von mittelkettenspezifischen Fettsäuren aufweisen sollen und solche Pflanzen, die natürlicherweise nicht diese Fettsäuren synthetisieren. In diesem Zusammenhang seien Ölpflanzen, wie beispielsweise Raps, Sonnenblume, Lein, Ölpalme und Soja genannt.

Die gentechnologische Einführung der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen, die für eine mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase kodieren, kann mit Hilfe üblicher Transformationstechniken durchgeführt werden. Solche Techniken umfassen Verfahren wie direkten Gentransfer, wie beispielsweise Mikroinjektion, Elektroporation, Particle gun, das Quellen von Pflanzenteilen in DNA-Lösungen, Pollen- oder Pollenschlauchtransformation, virale Vektoren und Liposomen-vermittelten Transfer sowie die Übertragung von entsprechenden rekombinanten Ti-Plasmiden oder Ri-Plasmiden mittels Agrobacterium tumefaciens und die Transformation durch Pflanzenviren.

In der vorliegenden Erfindung wurde zur Transformation die ClTE13-cDNA als ApaI-Eco RI-Fragment erstens hinter dem konstruierten Doppelpromotor der 35S RNA aus dem Cauliflower

Mosaik Virus (p35S/Δp35S) in den binären Vektor pRE9 (pNBM99-3TE) eingeführt, zweitens wurde dieses Fragment hinter den samenspezifischen ACP23-Promotor aus Raps in den binären Vektor pRE1 eingeführt (pNBM99-2TE). Des weiteren wurde ein XbaI-Fragment (7,3 kb) aus dem genomischen Klon ClTEg1 und ein SalII-Eco RI-Fragment (6 kb) aus dem genomischen Klon ClTEg16 in pRE1 eingeführt. Daraus resultieren die binären Vektoren pNBM99-TEg1 und pNBM99-TEg16. Das TE-Gen von ClTEg1 befindet sich in 3'-5'-Orientierung und das von ClTEg16 in 5'-3'-Orientierung in pRE1. Die funktionellen Teile der somit erhaltenen Expressionsvektoren sind in Figur 4 gezeigt.

Die in Figur 4 aufgeführten Abkürzungen haben folgende Bedeutungen:

RB und LB = rechte und linke Border der Transfer-DNA.
pACP23 = Promotor des Acyl-Carrier-Protein Gens 23 aus Raps
ClTE13 = cDNA 13 aus Cuphea lanceolata
tnos = Terminator des Nopalinsynthasegens aus Agrobacterium tumefaciens
NPTII = Neomycinphosphotransferasegen II
p35S = Promotor der 35S RNA des Cauliflower Mosaikvirus
t35S = Terminator der 35S RNA des Cauliflower Mosaikvirus
35s = Minimalpromotor der 35S RNA des Cauliflower Mosaic Virus

Durch Transformation der erfindungsgemäßen cDNA sowie der Gene aus den genomischen Klonen wurde die Mittelkettenspezifität der Thioesterasen untersucht. Geeignete Pflanzenmaterialien sind beispielsweise Raps und Tabak, da diese Pflanzen nur in der Lage sind, längerkettige Fettsäuren ab C_{16:0} zu produzieren.

Dazu wurden die Expressionsvektoren pNBM99-TEg1 bzw. pNBM99-TEg16 mittels Agrobacterium unabhängig voneinander in Raps transformiert. Der Expressionsvektor pNBM99-TEg1 wurde unter der Nummer DSM 8477 und der Expressionsvektor pNBM99-TEg16 unter der Nummer DSM 8478 am 27. August 1993 bei der DSM-

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH,
Mascheroder Weg 1B, D-38124 Braunschweig hinterlegt.

Die Expressionsvektoren pNBM99-2TE und pNBM99-3TE wurden mit Agrobacterium tumefaciens unabhängig voneinander in Tabak transformiert.

Die transformierten Raps- und Tabakpflanzen wurden dann auf ihren Gehalt an mittelkettigen Fettsäuren untersucht. Dazu wurden reifende Samen durch gaschromatographische Untersuchung analysiert. Die Figuren 5 und 6 zeigen das Gaschromatogramm von Fettsäureextrakten aus transgenen Rapssamen bzw. Tabaksamen, die mit der Konstruktion pNBM99-2TE transformiert wurden.

Aus den Gaschromatogrammen ist ersichtlich, daß transgener Raps wie auch transgener Tabak Caprinsäure (Peak C_{10:0}) produzieren. Daraus folgt, daß die cDNA ClTE13 und das Gen aus dem genomischen Klon ClTEg7 (siehe oben) eine Thioesterase kodieren, die C_{10:0}-spezifisch oder im wesentlichen C_{10:0}-spezifisch ist.

In weiteren Untersuchungen an transgenen reifen Rapssamen, die mit den Expressionsvektoren pNBM99-TEg1 bzw. pNBM99-TEg16 transformiert worden sind, konnte festgestellt werden, daß im Gaschromatogramm der Fettsäureextrakte im Fall des Gens aus dem genomischen Klon ClTEg1 (Figur 7) 1,7% Caprinsäure (C_{10:0}) und 0,4% Caprylsäure (C_{8:0}) und im Fall des Gens aus dem genomischen Klon ClTEg16 (Figur 8) 5,4% Myristinsäure (C_{14:0}) gebildet werden. Die nachfolgende Tabelle II zeigt die Änderung des Fettsäuremusters der untersuchten transgenen Rapspflanzen. Die Angaben beziehen sich auf %-Anteil an Fettsäure im reifen Samen.

Tabelle II

| Konstrukt | C_8 | C_{10} | C_{12} | C_{14} | C_{16} | $C_{18,0}$ | $C_{18,1}$ | $C_{18,2}$ | $C_{18,3}$ | $C_{20,0}$ |
|--------------|-------|----------|----------|----------|----------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Kontrolle | - | - | - | - | 3,0 | 2,3 | 76,5 | 9,9 | 6,0 | 0,8 |
| pNBM99-TEg1 | 0,4 | 1,7 | - | - | 3,4 | 2,2 | 75,4 | 8,2 | 6,5 | 0,8 |
| pNBM99-TEg16 | - | - | - | 5,4 | 13,4 | 1,9 | 56,6 | 13,7 | 7,1 | 0,7 |

Daraus folgt, daß das Gen aus dem genomischen Klon ClTEg1 und die cDNA ClTE12 (siehe oben) für eine $C_{10:0}$ -spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase oder im wesentlichen $C_{10:0}$ -spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase und das Gen aus dem genomischen Klon ClTEg16 für eine $C_{14:0}$ -spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase oder im wesentlichen $C_{14:0}$ -spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase kodieren. Beim Vergleich der Aminosäuresequenzen in Figur 3 fällt auf, daß der C_{10}/C_{14} -Unterschied von ClTEg1 und ClTEg16 auf geringe Sequenzunterschiede "RR" (Positionen 360/361), "M" (Position 371), "KE" (Positionen 395/396) und "D" (Position 398), etc. zurückgeführt werden kann. Es befinden sich zudem eine Lücke (fünf Aminosäuren) und Aminosäureaustausche im Bereich der Positionen 127 bis 135. Diese Regionen könnten einen Einfluß auf die Kettenlängenbegrenzung haben.

Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen und die Gene aus den isolierten genomischen Klonen aus *Cuphea lanceolata* sind in hervorragender Weise geeignet, transformierten Pflanzen die Fähigkeit zu verleihen, mittelkettenspezifische Fettsäuren zu bilden. Das bedeutet, daß ein vollfunktionsfähiges Gen für eine mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase übertragen werden kann. In gaschromatographischen Untersuchungen von transgenen Raps und Tabak wurde die Bildung von Caprinsäure und Myristinsäure durch Übertragung von Genen für eine $C_{10:0}$ - bzw. $C_{14:0}$ -spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase oder im wesentlichen $C_{10:0}$ - bzw. $C_{14:0}$ -spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase nachgewiesen. Es hat sich gezeigt, daß die erfindungsgemäße cDNA sowie die Gene aus den gezeigten genomischen Klonen als pflanzliche Gene nicht zu Schwierigkeiten in der Verträglichkeit in Raps und Tabak führen. Die ordnungsgemäße Kompartimentierung ist aufgrund der vorhandenen Transitpeptide gewährleistet. Für eine regulierte Expression der ClTE13-cDNA kann ein samenspezifisch exprimierender Promotor benutzt werden und die Gene aus den gezeigten genomischen Klonen werden selbst durch die eigenen Promotoren gewebespezifisch reguliert. Positionseffekte können durch die notwendige Anzahl von Transformanten ausgeglichen werden.

Somit eignen sich die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen in Form der präsentierten cDNAs als auch in Form der isolierten Gene der gezeigten genomischen Klone zur Produktion von mittelkettenspezifischen Fettsäuren in transgenen Pflanzen, vorzugsweise Ölpflanzen. Eine Optimierung des Gehaltes an mittelkettenspezifischen Fettsäuren kann durch zusätzlichen Transfer von Komponenten des Fettsäuresynthesesystems, wie z.B. DNA-Sequenzen für ACP2, einer spezifischen KAS, Ketoreduktase und Enoylreduktase, zum Beispiel aus Cuphea lanceolata, in Raps, erfolgen. Darüber hinaus ist zu erwarten, daß die cytoplasmatisch lokalisierte LPA-AT (Lysophosphatidsäure Acyltransferase) z.B. aus Cuphea lanceolata in Raps eine deutliche Steigerung des Gehalts an mittelkettigen Fettsäuren in den Triacylglyceriden mit sich bringt.

Die nachfolgenden Beispiele dienen zur Erläuterung der Erfindung.

Beispiele

Das im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendete Pflanzenmaterial bestand aus den Arten Brassica napus (Cruciferae) (Raps), Nicotiana tabacum (Solanaceae) (Tabak) und Cuphea lanceolata (Lythraceae) (lanzettblättriges Köcherblümchen oder Höckerblümchen). Zur Transformation wurde die Sommerrapssorte Drakkar und die Tabaklinie Petit Havanna SR1 verwendet.

Beispiel 1

Herstellung von cDNAs der Acyl-[ACP]-Thioesterase aus Cuphea lanceolata

Zunächst wurde eine cDNA-Bank aus Cuphea lanceolata (Wildtyp) hergestellt. Die cDNA-Bank wurde nach den Angaben des Herstellers (Stratagene) mit Hilfe des cDNA ZAP®-Synthese Kits hergestellt. Als Ausgangsmaterial zur Synthese der cDNAs diente polyA⁺-mRNA aus isolierten, etwa zwei bis drei Wochen alten unreifen Embryonen. Die auf diese Weise gewonnene cDNA-

Bank hat eine Größe von $9,6 \times 10^5$ rekombinanten Phagen mit einem Anteil von etwa 50% Klönen, deren Insertionen 500 bp übersteigen.

Zum Screenen der oben beschriebenen cDNA-Bank wurde eine spezifische Hybridisierungssonde für die Acyl-[ACP]-Thioesterase hergestellt. Dazu wurden zunächst geeignete degenerierte Oligonukleotide benötigt. Bei Voelker *et al* (1992), Science 257, Seiten 72-74 ist eine DNA-Sequenz einer pflanzlichen Acyl-[ACP]-Thioesterase wiedergegeben. Von einigen Bereichen der Sequenz, die möglichst wenig degeneriert sind, wurden Oligonukleotidprimer abgeleitet und synthetisiert. Der Primer 3532, der den Aminosäuren 277 bis 284 der Acyl-[ACP]-Thioesterase von Umbellularia californica entspricht, ist in PCR-Reaktionen in Verbindung mit dem Primer 2740 (ein modifizierter Oligo-dT-Primer mit Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BstBI, BamHI, HindIII und SalI) geeignet zur Amplifikation einer spezifischen Hybridisierungssonde.

Figur 1 zeigt die Sequenzen der für die PCR-Reaktionen verwendeten synthetischen Oligonukleotidprimer 3532 und 2740. Die Orientierung der Oligonukleotidprimer ist beim Primer 3532 von 5' bis 3', beim Primer 2740 von 3' bis 5'.

Ausgehend von 1 µg poly A⁺-RNA wurde mit reverser Transkriptase (Boehringer Mannheim GmbH) aus Avian Myeloblastosis Virus (AMV) während 30 Minuten bei einer Temperatur von 37°C eine cDNA-Synthese durchgeführt. Dazu wurde der in Figur 1 wiedergegebene 3'-Oligonukleotidprimer (2740) zur Synthese der spezifischen Hybridisierungssonde eingesetzt. Nach Inaktivierung der reversen Transkriptase durch Erhitzen während 5 Minuten bei einer Temperatur von 95°C wurde in dem gleichen Reaktionsansatz die PCR-Reaktion mit 50 pMol Endkonzentration je Primer und 4 Einheiten Ampli-Taq[®]-Polymerase (Perkin Elmer Cetus) durchgeführt. Die Reaktionen erfolgten unter den folgenden Bedingungen: a) Pufferbedingungen: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,01% Gelatine und 5 mM dNTPs,

b) Reaktionsdauer und -temperaturen: 3 Minuten bei 92°C zum erstmaligen Denaturieren, dann 25 bis 30 Temperaturzyklen mit: 2 Minuten bei 92°C zum Denaturieren, 2 Minuten bei 50°C zum Annealen der Oligonukleotide und 2,5 Minuten bei 72°C zur Amplifikation der DNA sowie abschließend 7 Minuten bei 72°C, um eine vollständige Synthese der letzten Syntheseprodukte zu erreichen.

Die entstandenen Amplifikationsprodukte wurden dann kloniert. Dazu wurde überstehende einzelsträngige DNA der PCR-Produkte mittels Klenow-Polymerase aufgefüllt und anschließend mit Polynukleotidkinase phosphoryliert (Sambrook et al., A Laboratory Manual, 2nd edn., (1989)). Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgt gemäß Standardprotokollen nach Sambrook et al. (supra) durch Agarose-Gelelektrophorese, Gelelution, Extraktion mit Phenol/Chloroform und abschließender Fällung mit Isopropanol. Die auf diese Weise gereinigte DNA wurde in SmaI gespaltene pBluescript®-Vektor-DNA ligiert und kloniert.

Anschließend wurde das klonierte PCR-Fragment nach der Methode von Sanger et al., Proc.Natl.Acad.Sci. 74, Seiten 5463-5467 sequenziert. Die DNA-Sequenzierung erfolgte teilweise radioaktiv mit Hilfe des Sequencing®-Kits bzw. mit Hilfe eines Pharmacia Automated Laser Fluorescent A.L.F.®-DNA-Sequenziergeräts. Die Sequenzen wurden mit Hilfe der Computer Software der University of Wisconsin Genetics Computer Group (Devereux et al., Nucl.Acids Res. 12, Seiten 387-395 analysiert.

Wie aus der als SEQ ID NO:8 im Sequenzprotokoll gezeigten Sequenz des 530 bp Acyl-[ACP]-Thioesterase-PCR-Produkts, PCR42, zu erkennen ist, konnte ein PCR-Produkt mit signifikanter Homologie zur Ausgangssequenz synthetisiert werden. Unter der DNA-Sequenz ist die korrespondierende Aminosäure dargestellt.

Das oben beschriebene 530 bp große PCR-Produkt wurde als Sonde zur Isolation von Acyl-[ACP]-Thioesterase-CDNAs verwendet.

Dazu wurde die oben beschriebene cDNA-Bank mit dem PCR-Produkt gescreened und 11 cDNAs isoliert, die aufgrund ihrer Sequenzen in drei Klassen eingeteilt werden können.

In diesem Zusammenhang wurden die cDNA-Klone ClTE13, ClTE5 und ClTE12 isoliert, die jeweils eine der drei Klassen repräsentieren. Ihre DNA-Sequenzen sowie die daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind als SEQ ID NO:1,2 und 3 im Sequenzprotokoll dargestellt.

Beispiel 2

Herstellung von genomischen Klonen der Acyl-[ACP]-Thioesterase aus Cuphea lanceolata

Hierzu wurde genomische DNA aus jungen Blättern von Cuphea lanceolata isoliert (S.L. Della Porta, J. Wood und J.B. Hicks, A plant DNA minipreparation: Version II, Plant.Mol.Biol.Rep.1, Seiten 19-21 (1983)). Die DNA wurde dann partiell mit dem Restriktionsenzym Sau3A gespalten, wonach DNA-Fragmente der Größenordnung zwischen 11000 bp und 19000 bp in den mit XbaI gespaltenen Vektor FIX II (Stratagene) kloniert wurden, nachdem die beteiligten Schnittstellen jeweils mit zwei Nukleotiden partiell aufgefüllt worden waren. Die nichtvervielfältigte genomische DNA-Bank repräsentierte 5,4 mal das Genom von Cuphea lanceolata. Mit der ClTE5-cDNA als Sonde wurden dann aus dieser Bank 103 hybridisierende Phagen isoliert, 40 davon weiter aufgereinigt und 23 kartiert. Diese lassen sich in vier Klassen einteilen. Hierzu wird auf Figur 2 verwiesen, die die genomischen Klone ClTEg1, ClTEg16, ClTEg4 und ClTEg7, welche unterschiedlichen Klassen zugeordnet werden, zeigen. Geeignete DNA-Fragmente der genomischen Klone wurden sequenziert. Ihre DNA-Sequenzen sowie die daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind als SEQ ID NO:4,5,6 und 7 im Sequenzprotokoll wiedergegeben.

Beispiel 3Transformation von Raps und Tabak

Es wurden geeignete Expressionsvektoren hergestellt. Dazu wurde ein chimäres Gen bestehend aus der ClTE13-cDNA, dem Promotor ACP23 und dem Terminator tnos in den binären Vektor pRE1 inseriert. Daraus resultiert der Vektor pNBM99-2TE. Der Vektor pNBM99-3TE wurde hergestellt, indem die ClTE13-cDNA nach dem konstruierten Doppelpromotor der 35S RNA aus dem Cauliflower Mosaic Virus (p35S/Δp35S) in den binären Vektor pRE9 eingeführt wurde. Weitere Expressionsvektoren wurden hergestellt unter Verwendung der genomischen Klone ClTEg1 und ClTEg16 und dem binären Vektor pRE1. Die somit erhaltenen Expressionsvektoren wurden mit pNBM99-TEg1 und pNBM99-TEg16 bezeichnet.

Die Transformation von Raps erfolgte mittels Agrobacterium tumefaciens nach dem Protokoll von De Block et al., Plant Physiol. 91, Seiten 694-701 ausgehend von Hypocotylstücken. Dabei wurde der Agrobakterienstamm GV3101 C58C1 Rif^r (Van Larebeke et al., Nature 252, Seiten 169-170 (1974)) mit dem Ti-Plasmid pMP90RK (C.Koncz, J. Schell, Mol.Gen.Genet. 204, Seiten 383-396 (1986)) und die oben genannten Expressionsvektoren verwendet. Die Selektion auf Kanamycin-Resistenz erfolgte mit 50 µg (Medium A5), später mit 15 µg Kanamycin (Monosulphat, Sigma K-4000) pro Milliliter Medium (Medium A6 und A8). Die Transformationsrate betrug 10%, bezogen auf die Anzahl ausgelegter Hypocotylstücke. Sie basiert auf der Verifizierung der Transformation mittels Southern-Blot (Sambrook et al., supra.) bzw. (PCR-Edwards et al., Nucl.Acids Res. 19, Seite 1349, (1991)).

Die Transformation von Tabak erfolgte mit dem oben genannten Vektorsystem nach dem "Leaf-Disk" Transformationsverfahren nach R.B. Horsch et al., Pant.Mol.Biol. 20, Seiten 1229-1231, (1985)).

Die Analyse der Fettsäuren in den transformierten Pflanzen wurde nach der Methode von W. Thies, Z. Pflanzenzüchtung 65, Seiten 181-202 (1971) und W. Thies, Proc. 4th Int.Rape Seed Con, 4.-8. Juni, Gießen, Seiten 275-282 (1974) mit Hilfe eines Hewlett-Packard Gaschromatographen (Modell HP5890 Serie II mit FID) und einer 10 m langen Kapillarsäule (FS-FFAP-CB-0,25 von CS-Chromatographie-Service GmbH, Langerwehe) durchgeführt. Mit Wasserstoff als Trägergas erfolgte die Trennung der Fettsäure-methylester in einem Temperaturgradienten von 140°C bis 208°C bei einem Temperaturanstieg von 20°C pro Minute. Nach Erreichen der Endtemperatur von 208°C verlief die Trennung isoterm über sieben Minuten. Injektor und Detektor wurden konstant bei 250°C betrieben.

Sollten in irgendeiner Weise molekularbiologische Arbeiten nicht hinreichend beschrieben sein, so wurden diese nach Standardmethoden, wie bei Sambrook et al, supra, beschrieben, durchgeführt.

Patentansprüche

1. DNA-Sequenzen, die für eine mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase kodieren, und die Allele sowie Derivate dieser DNA-Sequenzen.
2. DNA-Sequenzen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus Pflanzen isoliert sind.
3. DNA-Sequenzen nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus Cuphea lanceolata isoliert sind.
4. DNA-Sequenzen nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie für eine C_{10:0}-spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase oder im wesentlichen C_{10:0}-spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase kodieren.
5. DNA-Sequenzen nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie für eine C_{14:0}-spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase oder im wesentlichen C_{14:0}-spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase kodieren.
6. Genomische Klone, die das vollständige Gen für eine mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase und die Allele sowie Derivate dieses Gens enthalten.
7. Genomische Klone nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das vollständige Gen neben dem Strukturgen die Promotorsequenz und andere Regulatorsequenzen umfaßt.
8. Genomische Klone nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus genomischer Pflanzen-DNA isoliert sind.
9. Genomische Klone nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Pflanzen-DNA von Cuphea lanceolata stammt.

10. Genomischer Klon nach einem der Ansprüche 6 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase eine C_{10,0}-spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase oder im wesentlichen C_{10,0}-spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase ist.
11. Genomischer Klon nach einem der Ansprüche 6 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase eine C_{14,0}-spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase oder im wesentlichen C_{14,0}-spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase ist.
12. Genomische Klone ClTEg4 (DSM 8493) und ClTEg7 (DSM 8494).
13. Plasmide pNBM99-TEg1 (DSM 8477) und pNBM99-TEg16 (DSM 8478).
14. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen, Pflanzenteilen und Pflanzenprodukten, die Fettsäuren mittlerer Kettenlänge produzieren, bei dem eine DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder ein aus den genomischen Klonen oder Plasmiden nach einem der Ansprüche 6 bis 13 stammendes Gen auf gentechnologischem Weg übertragen wird.
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Pflanzen, Pflanzenteile und Pflanzenprodukte Caprinsäure (C_{10,0}) oder im wesentlichen Caprinsäure (C_{10,0}) produzieren.
16. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Pflanzen, Pflanzenteile und Pflanzenprodukte Myristinsäure (C_{14,0}) oder im wesentlichen Myristinsäure (C_{14,0}) produzieren.

17. Verfahren nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich DNA-Sequenzen, die für ACP2, eine spezifische KAS, Ketoreduktase und Enoylreduktase und gegebenenfalls Lysophosphatidsäure-Acyltransferase kodieren, übertragen werden.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA-Sequenz bzw. DNA-Sequenzen und die Gene durch Mikroinjektion, Elektroporation, Particle gun, das Quellen von Pflanzenteilen in DNA-Lösungen, Pollen- oder Pollenschlauchtransformation, Übertragung von entsprechenden rekombinanten Ti-Plasmiden oder Ri-Plasmiden von Agrobacterium tumefaciens, Liposomen-vermittelten Transfer oder durch Pflanzenviren übertragen wird bzw. werden.
19. Verwendung einer DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder eines aus den genomischen Klonen oder Plasmiden nach einem der Ansprüche 6 bis 13 stammenden Gens zur Übertragung von Genen für mittelketten-spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterasen in Pflanzen.
20. Verwendung nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß die mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase eine C_{10:0}-spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase oder im wesentlichen C_{10:0}-spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase ist.
21. Verwendung nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß die mittelkettenspezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase eine C_{14:0}-spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase oder im wesentlichen C_{14:0}-spezifische Acyl-[ACP]-Thioesterase ist.
22. Pflanzen, Pflanzenteile und Pflanzenprodukte hergestellt nach einem Verfahren der Ansprüche 14 bis 18.

1/16

Fig. 1

Acyl[ACP]-Thioesterase

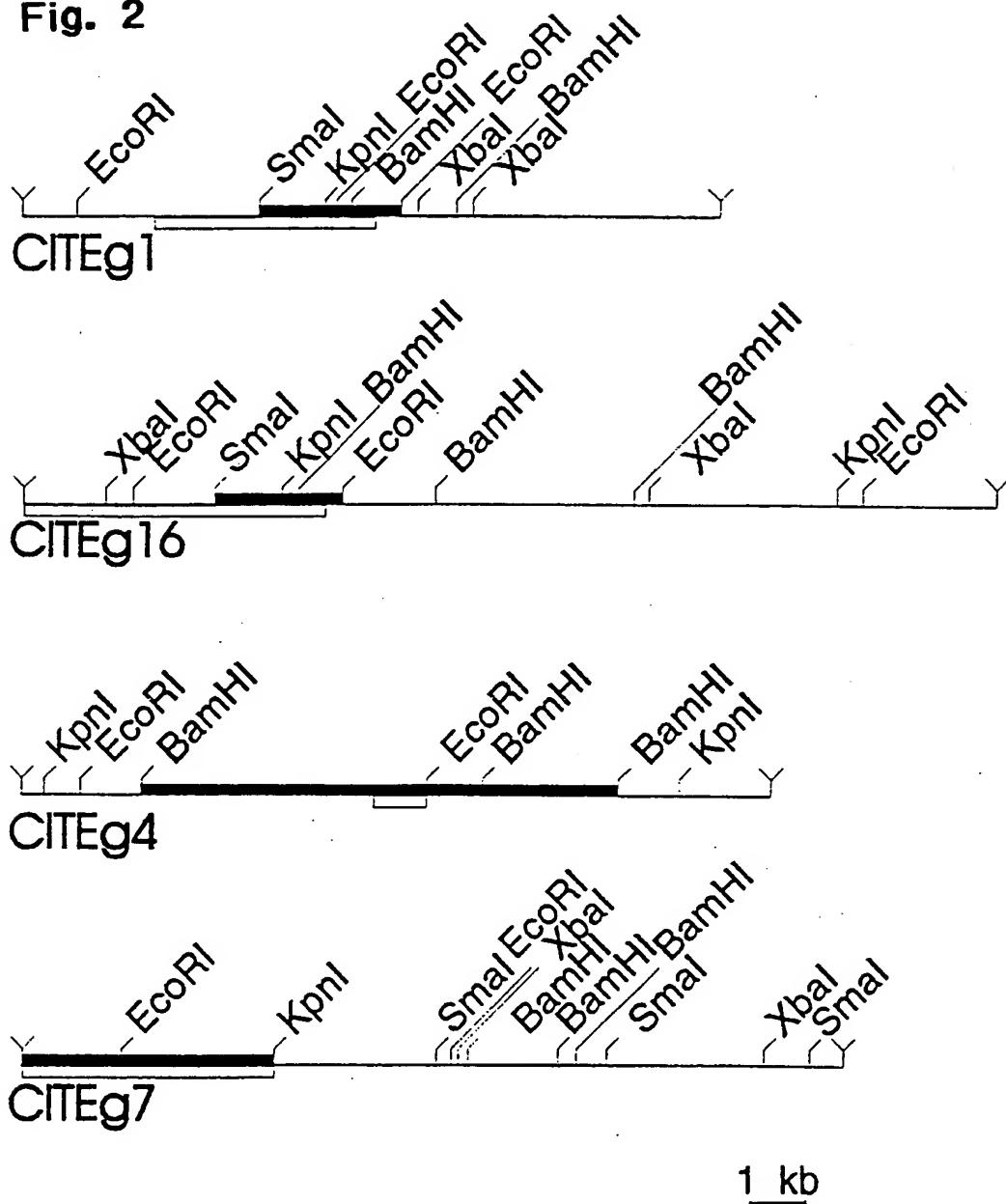
5' Primer Nummer 3532

5' $\begin{matrix} W & N & D & L & D & V & N & Q \\ TGG & AAC & GAC & CTI & GAC & GTI & AAC & GA \end{matrix}$

3' Primer Nummer 2740

3' $T_{18} CGAAGGATCCAAGCTTGTGACT$

2/16

Fig. 2

३

5/16

151

| | | | | | |
|---------|------------|------------|------------------------|------------|------------|
| Ctte2_1 | YEVGINKTAT | VETIANLLQE | VGGNHAQSVG | FSTDGFATT | TMRKLHLIWV |
| Ctte5_2 | YEVGINKTAT | IETIANLLQE | VGGNHAQGVG | FSTDGFATT | TMRKLHLIWV |
| Bnte2 | YEVGINKTAT | VETIANLLQE | VACNHVQKCG | FSTDGFATT | TMRKLHLIWV |
| Clte13 | YEIGADRTAS | IETVMNHLQE | TALNHVKSA _G | LLNDGFGRTP | EMFKRDLIWV |
| C1teg7 | YEIGADRTAS | IETVMNHLQE | TALNHVKSA _G | LLNDGFGRTP | EMFKRDLIWV |
| C1te5 | YEIGADRTAS | IETVMNHLQE | TALNHVKTAG | LSNDGFGRTP | EMYKRDLIWV |
| C1teg4 | YEIGADRTAS | IETVMNHLQ. | ... | ... | ... |
| C1teg16 | YEIGADRTAS | IETLMNHLQE | TSLNHCKSLG | LLNDGFGRTP | EMCKRDLIWV |
| Pcr42 | ... | ... | ... | ... | ... |
| C1te12 | YEIGADRTAS | IETLMNHLQE | TSINHCKSLG | LLNDGFGRTP | GMCKNDLIWV |
| C1teg1 | YEIGADRTAS | IETLMNHLQE | TSINHCKSLG | LLNDGFGRTP | GMCKNDLIWV |
| Ucte | YEVGPDRTS | ILAVMNHMQE | ATLNHAKS _V | ILGDGFGTTL | EMSKRDLMWV |

6/16

201

250

7/16

| | | | | | |
|---------|------------|------------|------------|-------------|-------------|
| Ctte2_1 | TSRMHIEIYR | YPAWSDVVEI | ETWCQSEGRI | GTRRDWIMKD | HASGEVIGRA |
| Ctte5_2 | TARMHIEIYR | YPAWSDVIEI | ETWVQGEGKV | GTRRDWILKD | YANGEVIGRA |
| Bnte2 | TARMHIEIYK | YPAWSDVVEI | ETWCQSEGRI | GTRRDWILRD | SATNEVIGRA |
| Clte13 | VAKMQVMVNR | YPTWGDTVEV | NTWVAKSGKN | GMRRDWLISD | CNTGEILTRA |
| C1teg7 | VAKMQVMVNR | YPTWGDTVEV | NTWVAKSGKN | GMRRDWLISD | CNTGEILTRA |
| C1te5 | VAKMQVMVNR | YPTWGDTVEV | NTWVAKSGKN | GMRRDWLISD | CNTGEILTRA |
| C1teg4 | • • • • • | • • • • • | • • • • • | • • • • • | • • • • • |
| C1teg16 | VTKMQVMVNR | YPTWGDTIEV | TTWVSESGKN | GMSRDWLLISD | CHSGEILLIRA |
| Pcr42 | • • • • • | • • • • • | • • • • • | • • • • • | • • • • • |
| C1te12 | LTKMQIMVNR | YPTWGDTVEI | NTWFQSCKI | GMASDWLISD | CNTGEILLIRA |
| C1teg1 | LTKMQIMVNR | YPTWGDTVEI | NTWFQSCKI | GMASDWLISD | CNTGEILLIRA |
| Ucte | VRRTHVAVER | YPTWGDTVEV | ECWIGASNN | GMRRDFLVRD | CKTGEILTRC |

301

LEDPAEYESTL GLVPRRADLD MNKHVNNVTRY IGWVLESIPQ EVIDTHELQT

Ctte2_1

LEDPAEYSRL GLVPRRSDL D MNKHVNNVTRY IGWALESIPP EIIDTHELQA

Ctte5_2

LEDPAQYSML ELKPRRADLD MNQHVNNVTRY IGWVLESIPQ EIIDTHELQV

Bnte2

EKTADSIRK GLTPKWNDLD VNQHVNNVKY IGWILESTPQ EVLETQELSS

Clte13

EKTADSIRK GLTPKWNDLD VNQHVNNVKY IGWILESTPQ EVLETQELSS

Clteg7

EKSADSIRK GLTPRWNLD VNQHVNNVKY IGWILESTPP EVLETQELCS

Clte5

EKSADSIRK GLTPRWNLD VNQHVNNVKY IGWILESTPP EVLETQELCS

Clteg4

VKTGDSIRN GLTPRWNDFD VNQHVNNVKY IAWLLKSVP T EVFETQELCG

Clteg16

VKTGDSIRN GLTPRWNDFD VNQHVNNVKY IAWLLKSVP T EVFETQELCG

Pcr42

VKTGDSIRN GLTPRWNDFD VNQHVSNVKY IAWLLKSVP T EVFETQELCG

Clte12

VKTGDSIRN GLTPRWNDFD VNQHVSNVKY IGWILLESMPI EVLETQELCS

Clteg1

VKTGDSIRN GLTPRWNDFD VNQHVSNVKY IGWILLESMPI EVLETQELCS

Ucte

DSTADDYIQC GLTPRWNDFD VNQHVNNLKY VAWVFETVPD SITESHHSS

350

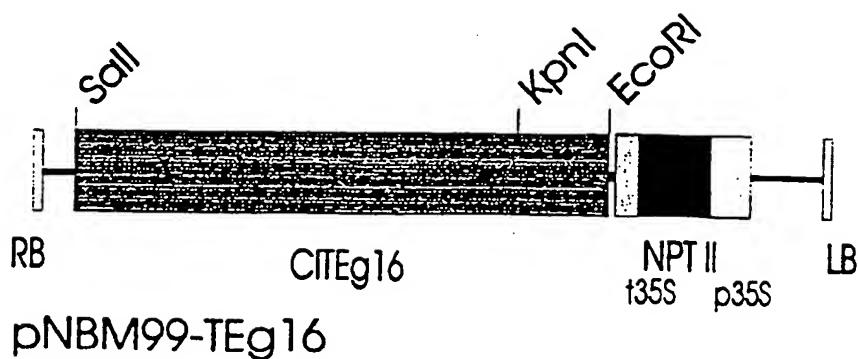
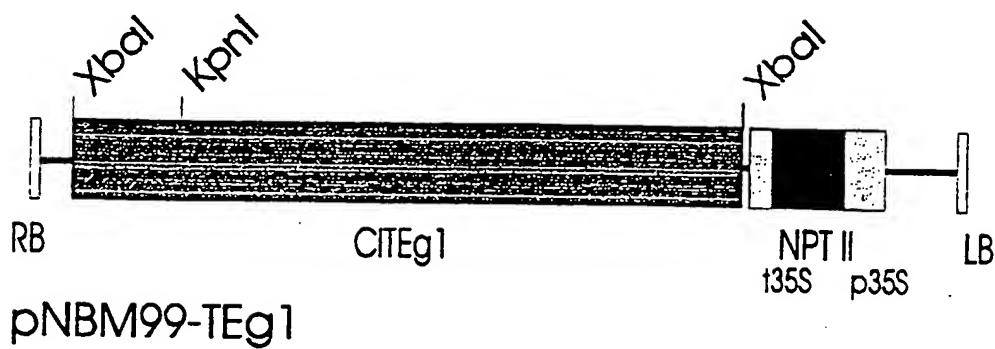
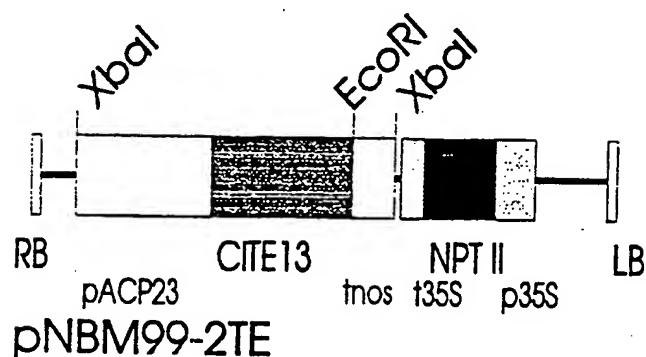
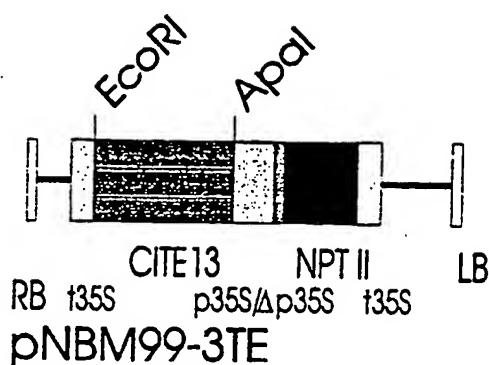
9/16

11/16

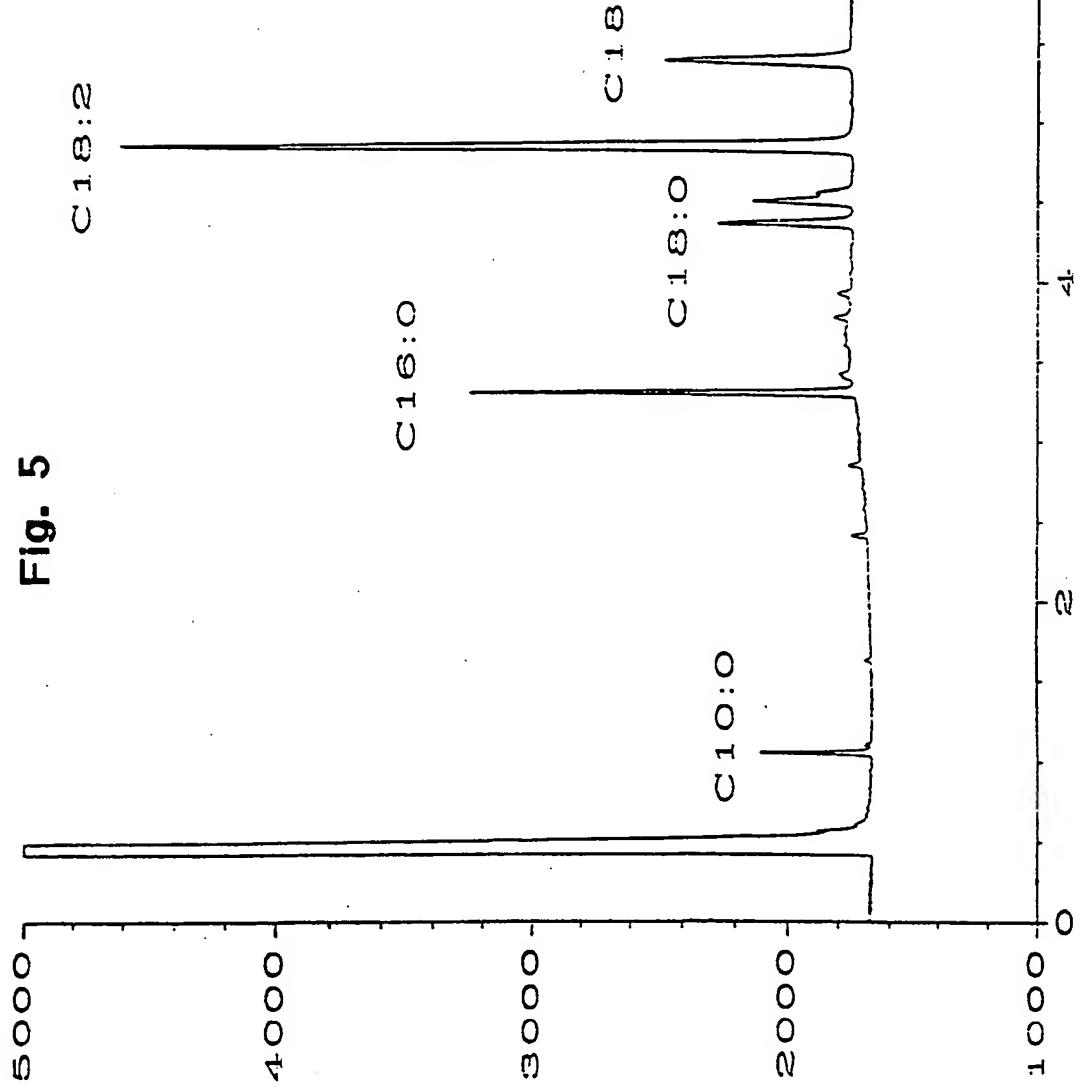
| | | | | | | | |
|---------|-------------|-------------|------------|------------|---------|---------|-------|
| 401 | RFLHLLRSG | DGLELNRGRT | EWRKKPAKK. | | | | |
| Ctte2_1 | RFMHLRLRSAG | SGLEINRCRT | EWRKKPAKR. | | | | |
| Ctte5_2 | QFLHMLRLSE | NGQEINNRGRT | QWRKKSSR. | | | | |
| Bnte2 | QFQHLLRL.E | DGGEIVKGRT | EWRPKTAGVN | GAIASGETSH | GDS. | | |
| Clte13 | QFQHLLRL.E | DGGEIVKGRT | EWRPKTAGVN | GAIASGETSH | GDS. | | |
| C1teg7 | QFQHLLRL.E | DGGEIVKGRT | EWRPKNAGIN | GGVPSEES. | | | |
| C1teg5 | QFQHLLRL.E | DGGEIVKGRT | EWRPKNAGIN | GGVPSEES. | | | |
| C1teg4 | LYQHLLRL.E | NGADIALGRT | EWRPKNAGAN | GAV.. | STGKT | SNGNSVS | |
| C1teg16 | LYQHLLRL.E | NGADIALGRT | EWRPKNAGAN | GAV.. | STGKT | SNGNSVS | |
| Pcr42 | QYKHLLRL.E | DGTDIVKSRT | EWRPKNAGTN | GAISTSTAKT | SNGNSAS | | |
| C1te12 | QYKHLLRL.E | DGTDIVKSRT | EWRPKNAGTN | GAISTSTAKT | SNGNSAS | | |
| C1teg1 | VCDHLLQL.E | GGSEVLRART | EWRPKLTDSF | RGISVIPAEF | RV. | | |
| Ucte | | | | | | | |

12/16

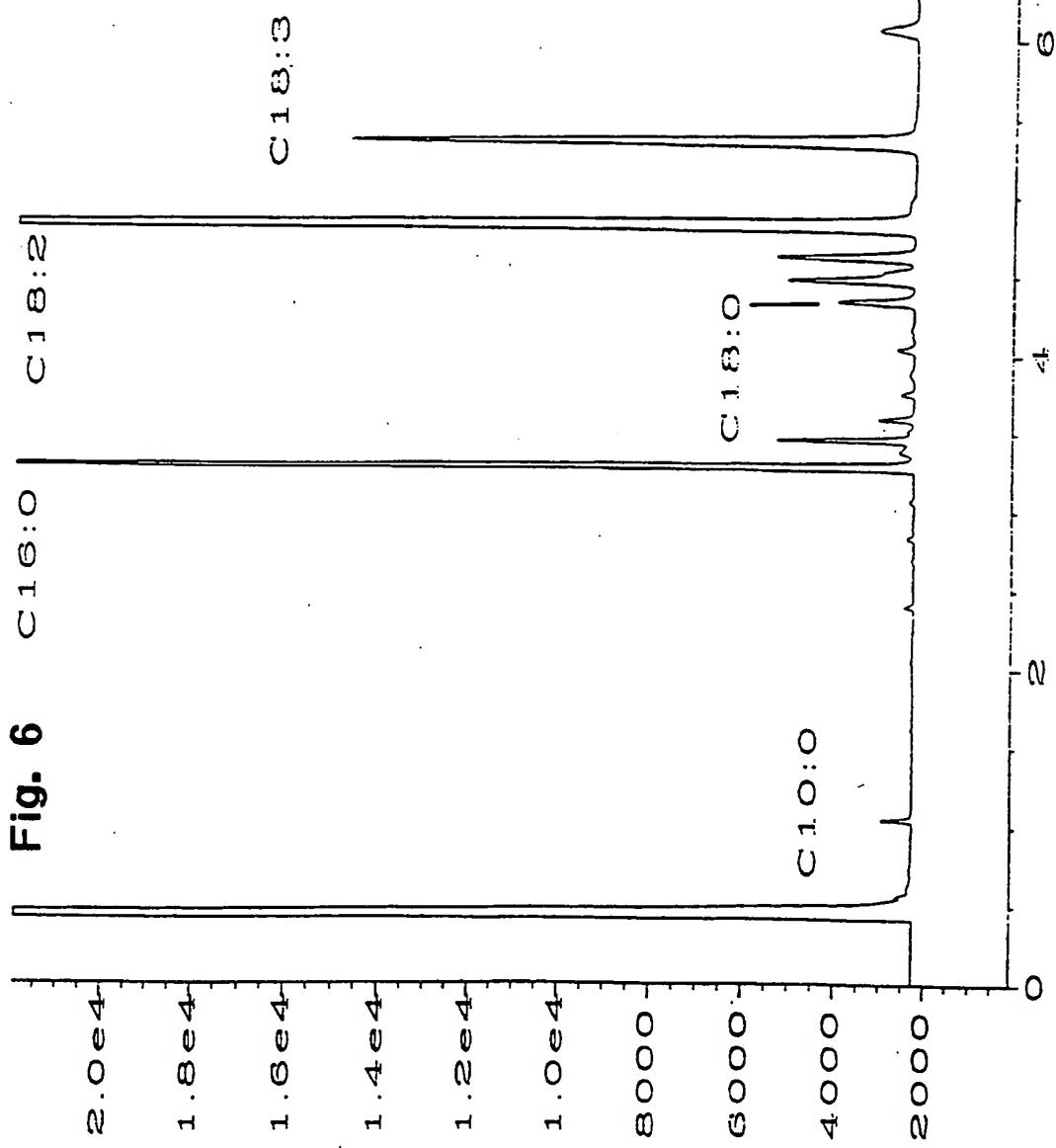
Fig. 4



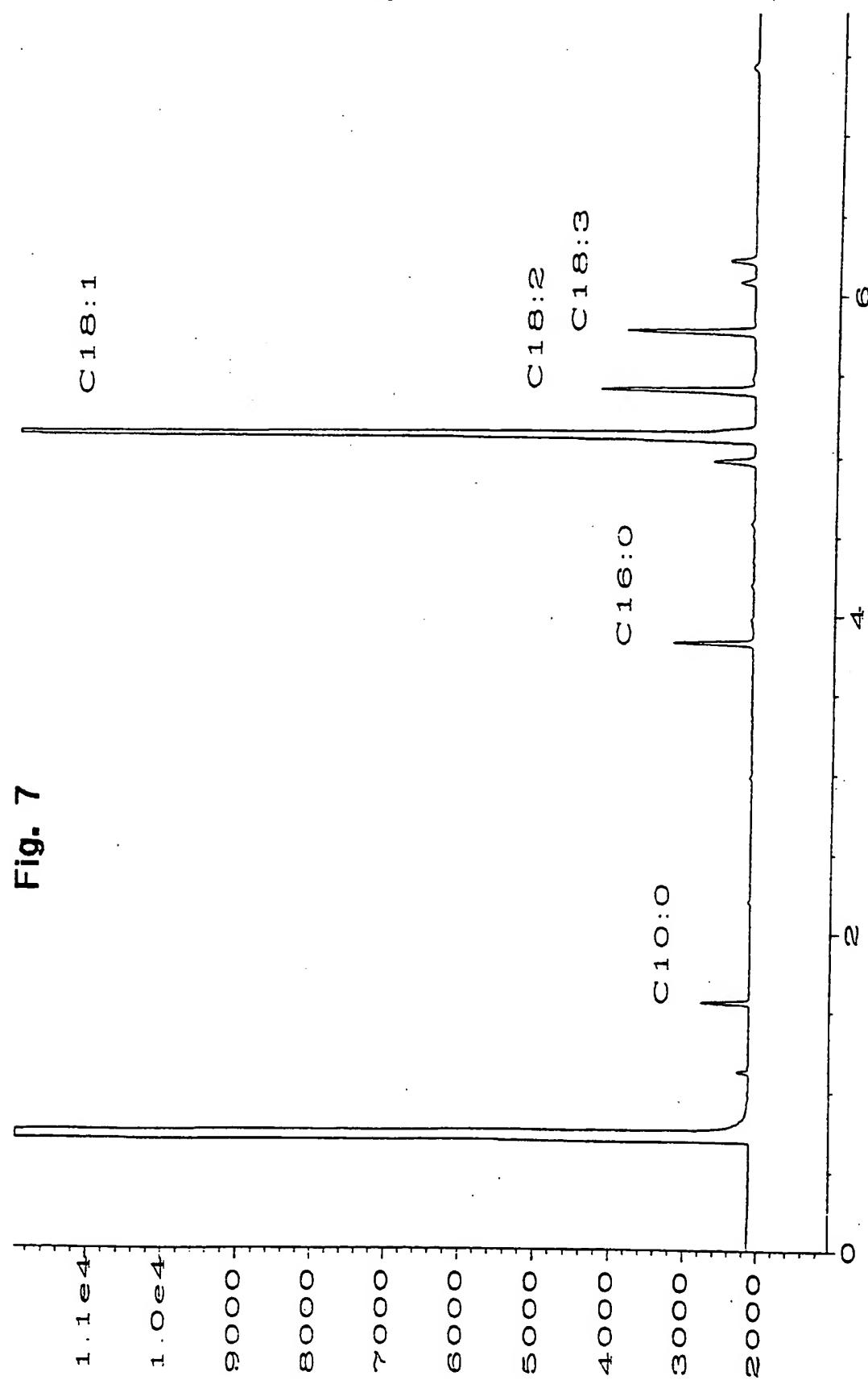
13/16



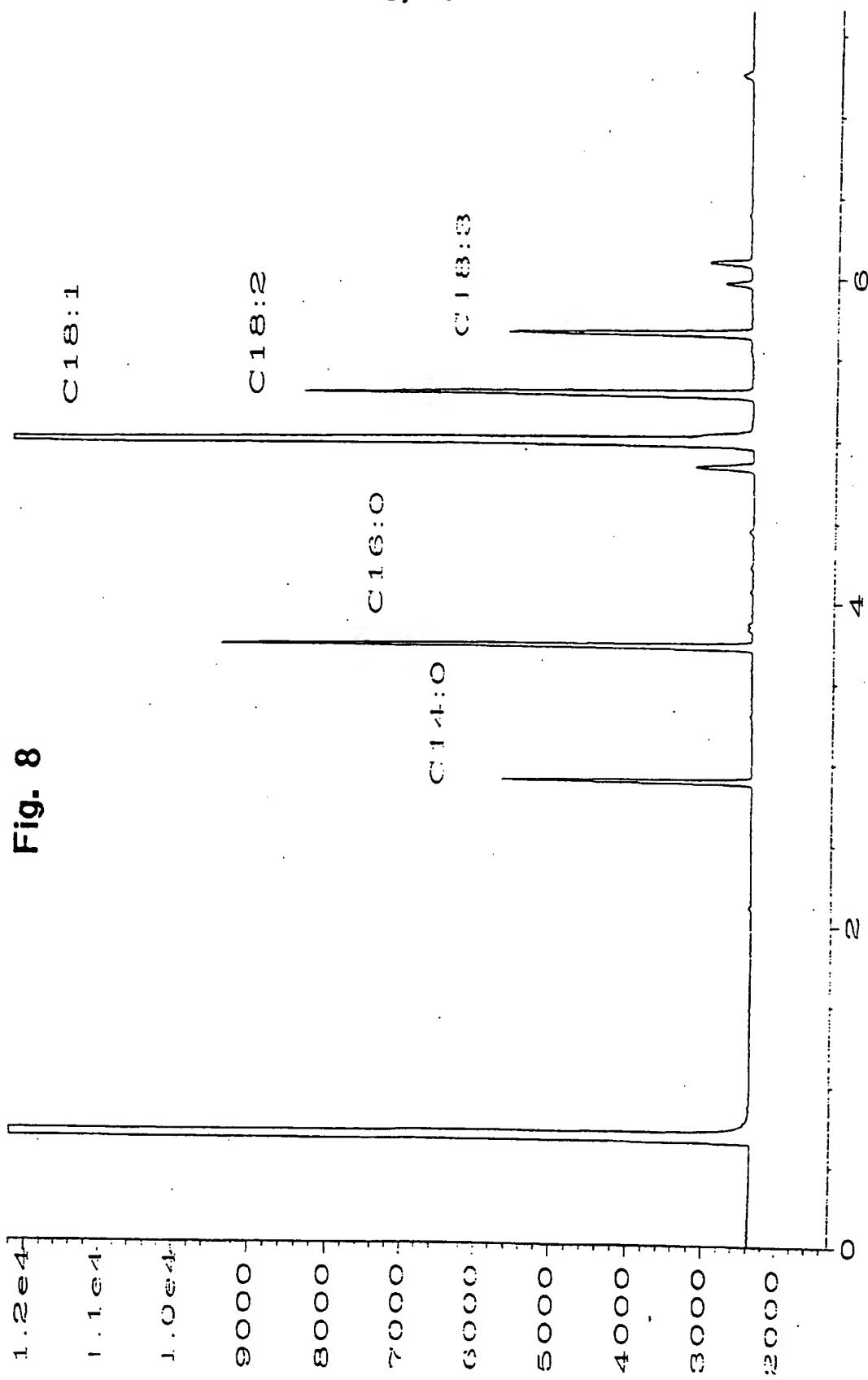
14/16



15/16



16/16



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat: Application No
PCT/EP 94/02935

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/82 C12N15/55 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| O,X | BIOL. CHEM. HOPPE SEYLER, vol.367, no.8, August 1993 page 532 MULLER, A., ET AL. 'Isogenes of the thioesterase from Cuphea lanceolata' see abstract PL38 --- | 1-3,6-9 |
| O,X | BIOL. CHEM. HOPPE SEYLER, vol.374, no.8, September 1993 page 531 MARTINI, N., ET AL. 'Thioesterase genes for the biosynthesis of medium chain fatty acids in seeds of Cuphea lanceolata' see abstract PL35 --- | 1-3,6-9 |
| X | WO,A,92 11373 (DU PONT) 9 July 1992 see page 57, line 21 - page 60, line 6 --- | 1-3,6,8, 9 -/- |

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

11 May 1995

18.05.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Maddox, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| | |
|-----------------|----------------|
| Internat | Application No |
| PCT/EP 94/02935 | |

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X | JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol.263, no.26, 15 September 1988, BALTIMORE, MD US pages 13393 - 13399 MIYAMOTO, C.M., ET AL. 'Organization of the lux structural genes of Vibrio harveyi' see figures 6,10 --- | 6,7 |
| X | SCIENCE, vol.257, 3 July 1992, LANCASTER, PA US pages 72 - 74 VOELKER, T. A., ET AL. 'Fatty acid biosynthesis redirected to medium chains in transgenic oilseed plants' cited in the application see the whole document --- | 1,2,14, 18,19,22 |
| X | WO,A,92 20236 (CALGENE) 26 November 1992 | 1,2,14, 18,19,22 |
| Y | see page 7, line 1 - line 7 see page 8, line 1 - line 10 --- | 8 |
| X | WO,A,91 16421 (CALGENE) 31 October 1991 cited in the application | 1,2 |
| Y | see page 6, line 24 - line 26 --- | 8 |
| P,X | WO,A,94 10288 (CALGENE) 11 May 1995 see page 25 - page 30 --- | 1-4, 19-22 |
| P,X | J. PLANT PHYSIOL., vol.143, 1994 pages 416 - 425 TÖPFER, R., ET AL. 'Molecular cloning of cDNAs or genes encoding proteins involved in de novo fatty acid biosynthesis in plants' see page 420, right column, last paragraph - page 421 --- | 10 |
| A | BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 96 Philadelphia, PA, US; abstract no. 9558, DÖRMANN, P., ET AL. 'Characterization of two acyl-acyl carrier protein thioesterases from developing Cuphea seeds specific for medium-chain and oleoyl-acyl carrier protein' see abstract & PLANTA, vol.189, no.3, 1993 pages 425 - 432 --- | 1-22 |
| 1 | | -/- |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| | |
|-----------------|----------------|
| Internat | Application No |
| PCT/EP 94/02935 | |

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| A | FETT WISSENSCHAFT TECHNOLOGIE, vol.93, no.11, November 1991 page 417 SCHUCH, R., ET AL. 'Enzyme für die Synthese mittelkettiger Fettsäuren aus Cuphea lanceolata' see the whole document --- | 1-22 |
| E | WO,A,95 07357 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT) 16 March 1995 see seq. id's 31-34 see page 18 - page 23 ----- | 1-22 |

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

| | |
|----------|----------------|
| Internat | Application No |
| PCT/EP | 94/02935 |

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------|---------------------|
| WO-A-9211373 | 09-07-92 | AU-A- | 9116191 | 22-07-92 |
| | | EP-A- | 0563191 | 06-10-93 |
| ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| WO-A-9220236 | 26-11-92 | EP-A- | 0557469 | 01-09-93 |
| | | JP-T- | 7501924 | 02-03-95 |
| ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| WO-A-9116421 | 31-10-91 | US-A- | 5298421 | 29-03-94 |
| | | US-A- | 5344771 | 06-09-94 |
| | | EP-A- | 0480024 | 15-04-92 |
| | | US-A- | 5304481 | 19-04-94 |
| ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| WO-A-9410288 | 11-05-94 | NONE | | |
| ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| WO-A-9507357 | 16-03-95 | NONE | | |
| ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat. Aktenzeichen
PCT/EP 94/02935

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N15/82 C12N15/55 A01H5/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprästoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)
IPK 6 C12N A01H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| 0,X | BIOL. CHEM. HOPPE SEYLER, Bd.367, Nr.8, August 1993 Seite 532 MÜLLER, A., ET AL. 'Isogenes of the thioesterase from Cuphea lanceolata' siehe Zusammenfassung PL38 --- | 1-3,6-9 |
| 0,X | BIOL. CHEM. HOPPE SEYLER, Bd.374, Nr.8, September 1993 Seite 531 MARTINI, N., ET AL. 'Thioesterase genes for the biosynthesis of medium chain fatty acids in seeds of Cuphea lanceolata' siehe Zusammenfassung PL35 --- | 1-3,6-9 -/- |

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
 - *'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
 - *'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
 - *'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
 - *'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
 - *'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- *'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
 - *'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
 - *'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nabeliegend ist
 - *& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

| | |
|--|---|
| Datum des Abschlusses der internationalen Recherche | Abschiedsdatum des internationalen Recherchenberichts |
| 11. Mai 1995 | 18 -05- 1995 |
| Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016 | Bevollmächtigter Bediensteter Maddox, A |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

| | |
|-----------------|--------------|
| Internat | Aktenzeichen |
| PCT/EP 94/02935 | |

| C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
|--|---|---------------------|
| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
| X | WO,A,92 11373 (DU PONT) 9. Juli 1992 siehe Seite 57, Zeile 21 - Seite 60, Zeile 6 --- | 1-3,6,8, 9 |
| X | JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd.263, Nr.26, 15. September 1988, BALTIMORE, MD US Seiten 13393 - 13399 MIYAMOTO, C.M., ET AL. 'Organization of the lux structural genes of Vibrio harveyi' siehe Abbildungen 6,10 --- | 6,7 |
| X | SCIENCE, Bd.257, 3. Juli 1992, LANCASTER, PA US Seiten 72 - 74 VOELKER, T. A., ET AL. 'Fatty acid biosynthesis redirected to medium chains in transgenic oilseed plants' in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument --- | 1,2,14, 18,19,22 |
| X | WO,A,92 20236 (CALGENE) 26. November 1992 | 1,2,14, 18,19,22 |
| Y | siehe Seite 7, Zeile 1 - Zeile 7 siehe Seite 8, Zeile 1 - Zeile 10 --- | 8 |
| X | WO,A,91 16421 (CALGENE) 31. Oktober 1991 in der Anmeldung erwähnt | 1,2 |
| Y | siehe Seite 6, Zeile 24 - Zeile 26 --- | 8 |
| P,X | WO,A,94 10288 (CALGENE) 11. Mai 1995 siehe Seite 25 - Seite 30 --- | 1-4, 19-22 |
| P,X | J. PLANT PHYSIOL., Bd.143, 1994 Seiten 416 - 425 TÖPFER, R., ET AL. 'Molecular cloning of cDNAs or genes encoding proteins involved in de novo fatty acid biosynthesis in plants' siehe Seite 420, rechte Spalte, letzter Absatz - Seite 421 --- | 10 |
| | | -/- |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat. Aktenzeichen

PCT/EP 94/02935

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| A | <p>BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 96 Philadelphia, PA, US; abstract no. 9558, DÖRMANN, P., ET AL. 'Characterization of two acyl-acyl carrier protein thioesterases from developing Cuphea seeds specific for medium-chain and oleoyl-acyl carrier protein' siehe Zusammenfassung & PLANTA, Bd.189, Nr.3, 1993 Seiten 425 - 432 ----</p> | 1-22 |
| A | <p>FETT WISSENSCHAFT TECHNOLOGIE, Bd.93, Nr.11, November 1991 Seite 417 SCHUCH, R., ET AL. 'Enzyme für die Synthese mittelkettiger Fettsäuren aus Cuphea lanceolata' siehe das ganze Dokument ----</p> | 1-22 |
| E | <p>WO,A,95 07357 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT) 16. März 1995 siehe seq. id's 31-34 siehe Seite 18 - Seite 23 -----</p> | 1-22 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internat. Aktenzeichen

PCT/EP 94/02935

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|---|----------------------------|--|--|
| WO-A-9211373 | 09-07-92 | AU-A- 9116191 EP-A- 0563191 | 22-07-92 06-10-93 |
| WO-A-9220236 | 26-11-92 | EP-A- 0557469 JP-T- 7501924 | 01-09-93 02-03-95 |
| WO-A-9116421 | 31-10-91 | US-A- 5298421 US-A- 5344771 EP-A- 0480024 US-A- 5304481 | 29-03-94 06-09-94 15-04-92 19-04-94 |
| WO-A-9410288 | 11-05-94 | KEINE | |
| WO-A-9507357 | 16-03-95 | KEINE | |